Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. F. Lembeck

Der Einfluß von Dimethylnitrosamin, Tetrachlorkohlenstoff, Buttergelb und Cyclophosphamid auf den Leucineinbau in Fraktionen von Leberhomogenaten nach metabolischer Aktivierung in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Fritz Schnitger
aus Berlin

1968

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. F. Lembeck

Der Einfluß von Dimethylnitrosamin, Tetrachlorkohlenstoff, Buttergelb und Cyclophosphamid auf den Leucineinbau in Fraktionen von Leberhomogenaten nach metabolischer Aktivierung in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Fritz Schnitger
aus Berlin

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. W. Graumann

1. Berichterstatter: Dozent Dr. H. Uehleke
(Professor Dr. F. Lembeck)

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Remmer

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung und Fragestellung 1

2. Gang der Untersuchungen und Ergebnisse 5

2.1 Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen 6

2.11 Leucineinbau bei verschiedenen Bedingungen 6

2.12 Ermittlung der Oxydase-Aktivität in den einzelnen Zellfraktionen unter verschiedenen Versuchsbedingungen . 9

2.2 Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff auf den Leucineinbau 12

2.3 Einfluß von Buttergelb und Buttergelb-N-Oxyd auf den Leucineinbau 12

2.4 Einfluß von Dimethylnitrosamin auf den Leucineinbau 13

2.5 Einfluß von Cyclophosphamid auf den Leucineinbau 13

2.6 Tabellen 14

3. Diskussion 17

4. Materialien und Methoden 21

4.1 Abkürzungen 21

4.2 Chemikalien 21

4.3 Tiere 22

4.4 Lösungen 22

4.41 Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung . . . 22

4.42 Krebs-Ringer-Phosphat-Thioäthanol-Lösung 22

4.5 Präparation der Zellfraktionen 22

4.51 Homogenat, 9000 x g Überstand und Mikrosomen 22

4.52 pH 5-Fraktion 23

Seite

4.6 Ansätze zur Messung des Leucineinbaues . 24
4.61 Standardansatz mit Mikrosomen . . . 25
4.62 Standardansatz mit 9000 x g Überstand und mit Homogenat 26
4.63 $NADPH_2$-regenerierendes System in Leucin-einbauenden Ansätzen 26
4.64 Vorinkubationen 27
4.7 Quantitative Bestimmung des Leucineinbaues 27
4.8 Entalkylierungsansätze 28
4.9 Bestimmungsmethoden 29
4.91 Anilinbestimmung 29
4.92 Proteinbestimmung 29
5. Zusammenfassung 31
6. Literaturverzeichnis 32

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Chemisch ganz verschiedene Fremdstoffe - darunter auch Arzneimittel - besitzen schädliche Wirkungen auf die Leber. Man hat diese "Giftwirkungen" durch Beeinflussung von Funktionen der Leberzellen zu erklären versucht, die dann zu Veränderungen der Struktur führen. Viele Untersuchungen richteten sich dabei auf die Eiweißsynthese in der Leber. In diesem Zusammenhang erfuhren solche Substanzen besonderes Interesse, die selber gar nicht oder nur kaum wirksam sind, aber im Stoffwechsel zu sehr aktiven und häufig schädlichen Verbindungen umgewandelt werden, wie zum Beispiel Tetrachlorkohlenstoff, Nitrosamine und einige carcinogene Arylamine. Die Aufklärung des Mechanismus der zellulären Proteinbildung führte zu zahlreichen Versuchen, die zeigen sollten, wie solche Stoffe in die Eiweißsynthese eingreifen.

HULTIN et al. (24) fanden, daß bei Ratten zwei Stunden nach Verabfolgung von Dimethylnitrosamin, einer lebertoxischen und carcinogenen Substanz, der Leucineinbau in isolierten Lebermikrosomen gehemmt ist. Der Pyrophosphatumsatz war unter diesen Bedingungen nicht verändert. Ebenso war die Aktivität der Enzyme im 105000 x g Überstand nicht beeinträchtigt. Vorinkubation von Leberschnitten mit Dimethylnitrosamin hatte ebenfalls einen verminderten Aminosäureeinbau zur Folge. MUKHERJEE et al. (44) sahen ähnliche Effekte im 14000 x g Überstand von Rattenleberhomogenaten nach Gabe von Dimethylnitrosamin. Wenn sie die Tiere erst 20 Stunden nach der Dimethylnitrosamin-Verabreichung töteten, war die Wirkung je nach Dosis sehr verschieden: geringe Dosen Dimethylnitrosamin bewirkten eine Steigerung des Aminosäureeinbaues, hohe Dosen dagegen eine Verminderung. Die gesteigerte Eiweißsynthese bei niedriger Dimethyl-

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547604_0031

bation von Leberschnitten mit CCl_4. Die Bildung des Komplexes zwischen transfer Ribonucleinsäuren und Aminosäuren sowie die Aktivität des enzymhaltigen 105000 g Überstandes waren dabei normal. Dagegen war die Stimulierbarkeit des Phenylalanineinbaues durch Polyuridylsäure nach CCl_4-Vorbehandlung verändert. Wurde CCl_4 erst in vitro dem Aminosäureeinbauenden System zugesetzt, so sah man keine Wirkung (57,58). Ein Zusammenhang aller dieser Erscheinungen mit der nach Tetrachlorkohlenstoffgabe beobachteten Lipidperoxidation wird diskutiert (1,49).

Insgesamt gesehen sind die Ergebnisse nur sehr schwer zu deuten und teilweise auch widersprüchlich. Dies beruht einmal darauf, daß die einzelnen Untersucher unterschiedliche Versuchsanordnungen und Leberzellpräparationen benutzten. Ein weiterer wesentlicher Grund für die Schwierigkeiten bei der Interpretation ist die Tatsache, daß in den bisherigen Untersuchungen die Substanzen zumeist in vivo verabfolgt wurden. Dadurch können indirekte Mechanismen, zum Beispiel Veränderungen im Hormonhaushalt (7,8,15) oder Ernährungseinflüsse (8,69) nicht ausgeschlossen werden. Zur Klärung des gesamten Fragenkomplexes war es daher von großem Interesse, ob sich ähnliche Einflüsse auf die Proteinsynthese in zellfreien, Aminosäuren einbauenden Systemen aus Leber auch bei Zugabe der genannten Substanzen in vitro zeigten, da in einem solchen System viele indirekte Einflüsse entfallen. Untersuchungen über Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus sind so besser überschaubar.

Deshalb wurde der Einfluß von Dimethylnitrosamin, Dimethylaminoazobenzol und Tetrachlorkohlenstoff auf den Leucineinbau in verschiedenen zellfreien, Aminosäuren inkorporierenden Systemen aus Rattenlebern gemessen. Außerdem wurden analoge Versuche mit Cyclophosphamid (Endoxan^R) durchgeführt, einer Substanz, die auch erst im Organismus in eine wirksame -

cytostatische - Verbindung umgewandelt wird (6).

Die vielfältigen Wirkungen der untersuchten Verbindungen werden möglicherweise nicht durch die Substanzen selber, sondern durch noch nicht sicher nachgewiesene, vor allem in der Leber gebildete Metaboliten hervorgerufen (6,41,49,57). Die Metaboliten reagieren dabei zum Teil wahrscheinlich in statu nascendi mit Proteinen, Lipiden und Ribonucleinsäuren und werden so biologisch wirksam. Die räumlichen Verhältnisse der Reaktionspartner zum Zeitpunkt der biochemischen Transformation sind offenbar dabei wichtig, und man muß dies berücksichtigen, wenn man versucht, in vitro Bedingungen zu schaffen, die denen in vivo möglichst nahe kommen sollen.

Deshalb wurden in einigen Versuchsreihen die untersuchten Substanzen mit Mikrosomen und $NADPH_2$ vorinkubiert, bevor sie dem Aminosäuren einbauenden Ansatz zugesetzt wurden, oder es wurde der Leucineinbau in Anwesenheit von $NADPH_2$ durchgeführt. Da die Geschwindigkeit der Metabolisierung in solchen Ansätzen durch Phenobarbital stimulierbar ist (50), wurden zur Gewinnung der Zellfraktionen mit Phenobarbital vorbehandelte Tiere benutzt.

2. GANG DER VERSUCHE UND ERGEBNISSE [+)]

Über die Biosynthese der Proteine herrscht heute folgende Vorstellung (8): Zuerst werden Aminosäuren (AS) mit ATP in eine energiereiche Bindung mit AMP gebracht. Die aktivierten Aminosäuren werden dann auf die für jede Aminosäure spezifische transfer-Ribonucleinsäure (sRNA) übertragen. Im nächsten Schritt wird das RNA - Ende des sRNA - AS - Komplexes an den Ribosomen an messenger-Ribonucleinsäure (mRNA) gebunden. Nunmehr kann die Peptidbindung zwischen den am Ribosomen - mRNA - Komplex gebundenen benachbarten Aminosäuren geknüpft werden, wobei die sRNA der praeterminalen Aminosäure frei wird.

Schematisch läßt sich dieser Vorgang wie folgt darstellen (58):

I. Aminosäureaktivierung:

$$AS + ATP \xrightarrow[pH_5\,Enzyme,\ Mg^{++}]{} AS\text{-}AMP + PP_1$$

II. Bildung der Aminoacyl-sRNS:

$$AS\text{-}AMP + sRNS \xrightarrow[pH_5\,Enzyme,\ Mg^{++}]{} sRNS\text{-}AS + AMP$$

III Bindung an Ribosom-mRNS:

$$sRNS\text{-}AS + mRNS\text{-}Ribosom \xrightarrow[Bindungsenzyme]{GTP} AS\text{-}sRNS\text{-}Ribos.\text{-}mRNS$$

IV. Peptidverknüpfung und Ablösung:

$$AS\text{-}sRNS\text{-}mRNS \xrightarrow[Synthease]{} (AS)_x\text{-}mRNS\text{-}Ribos. \xrightarrow[Ablös.]{} \begin{matrix} Protein \\ mRNS \\ Ribosomen \end{matrix}$$

[+)] Abkürzungen s.S. 21 (4.1)

In Übereinstimmung mit diesem Schema ist es möglich, in einem Inkubat von isolierten Leberribosomen mit einer die notwendigen Enzyme und Ribonucleinsäuren enthaltenden Zellfraktionen (pH 5-Fraktion), einem ATP-regenerierenden System (ATP, Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase) sowie GTP und Mg^{++}-Ionen radioaktiv markierte Aminosäuren in Protein einzubauen. Das Ausmaß des Einbaues kann dann bestimmt werden, indem ein aliquoter Teil des Inkubates auf Filterpapierplättchen pipettiert wird, das enthaltene Eiweiß durch Eintauchen in Trichloressigsäure an das Filterpapier praecipitiert wird und nach Auswaschen aller nicht eiweißartigen Bestandteile die Radioaktivität der am Plättchen haftenden Proteine gemessen wird (39). Ein Maß für den Leucineinbau ist dann die Zahl der Impulse des Plättchens pro Minute, bezogen auf die Mikrosomenkonzentration im Ansatz = Ipm/mg mikrosomales Protein. Der Leucineinbau seinerseits ist ein Anhaltspunkt für die Proteinsynthese.

2.1 Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen

2.11 Leucineinbau unter verschiedenen Bedingungen

Ausgehend von den von MUNROE et al.(45) und MILLER et al.(42) verwandten Konzentrationen wurde der Leucineinbau in Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen von ^{14}C-Leucin, Tris-HCl-Puffer, Saccharose, KCl, Mg^{++}, ATP, pH-5-Fraktion, GTP, PEP und Pyruvatkinase bestimmt. Als optimal wurden so die in Abb. 1 angegebenen Konzentrationen ermittelt.

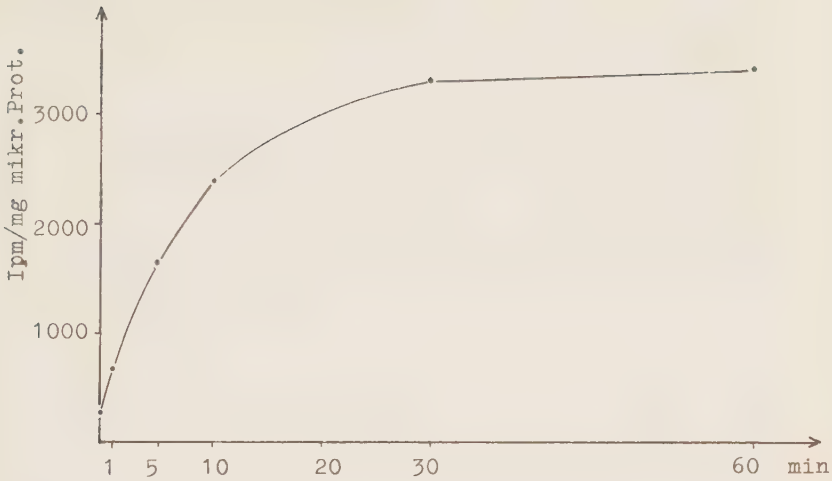

Abb. 1:
Zeitlicher Verlauf des Einbaues von ^{14}C-Leucin in isolierten Rattenlebermikrosomen bei 37°C. Die Konzentrationen pro ml Ansatz betrugen: 12 µMol Tris-HCl-Puffer pH 7,6, 30 µMol Sacharose, 17,5 µMol KCl, 20 µMol $MgCl_2$, 4,5 µMol Thioäthanol, 0,5 µMol GTP, 2 µMol ATP, 15 µMol PEP, 50 µg Pyruvatkinase, 2 mg Protein pH-5-Fraktion, 2 mg mikrosomales Protein, 0,45 µCi 1-^{14}C Leucin.

Die Abhängigkeit des Leucineinbaues von der Inkubationsdauer ist in Abb. 1 anhand eines typischen Versuches wiedergegeben. Die Einbaugeschwindigkeit von Leucin in mikrosomale Proteine nimmt mit zunehmender Inkubationsdauer ab. Nach 30 min kommt die Reaktion zum Stillstand, so daß diese Inkubationsdauer für vergleichende Untersuchungen geeignet ist.

In einigen Versuchen wurden die untersuchten Verbindungen zunächst nur mit Mikrosomen und $NADPH_2$ inkubiert, um Metaboliten entstehen zu lassen (Vorinkubation). Ein aliquoter

Teil dieses vorinkubierten Ansatzes wurde dann einem leucineinbauenden System zugegeben, so daß der Leucineinbau von Anfang an unter Einwirkung der bereits gebildeten Metaboliten stand.

Vorinkubation der Mikrosomen verminderte jedoch die Fähigkeit der Mikrosomen, Leucin einzubauen, erheblich (Abb. 2). Daher enthielten die Aminosäuren einbauenden Ansätze, denen Vorinkubat zugegeben war, zusätzlich noch frische Mikrosomen in der Konzentration normaler Ansätze (s.Abb. 1).

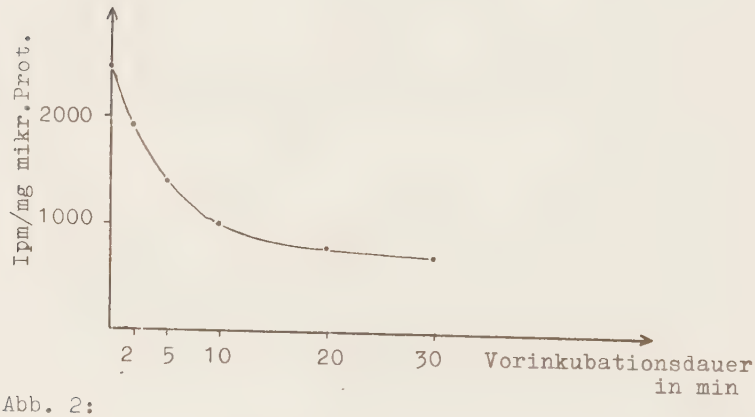

Abb. 2:
Einfluß der Vorinkubation auf den ^{14}C-Leucineinbau in Rattenlebermikrosomen. Nach Vorinkubation der Mikrosomen bei 37°C in KRP wurde der Einbau durch Zugabe von ATP-regenerierendem System, pH-5-Fraktion und ^{14}C-Leucin gestartet und nach 30 min Inkubation bei 37°C gemessen. Die Konzentrationen im Ansatz waren die gleichen wie bei Abb. 1.

Da DAB, DAB-N-Oxyd und Tetrachlorkohlenstoff schlecht wasserlöslich sind, mußte in Ansätzen mit diesen Substanzen ein Lösungsvermittler verwandt werden. In Vorversuchen erwies

sich dazu DMSO als gut geeignet, da es in den als Lösungsvermittler erreichten Konzentrationen keinen wesentlichen Eigeneffekt auf den Leucineinbau in den verwandten Versuchsanordnungen zeigte. Außerdem wurde in jeder Versuchsreihe ein Ansatz mit entsprechender DMSO-Konzentration mitbestimmt, der als Kontrolle diente.

2.12 Ermittlung der Oxydase-Aktivität in den einzelnen Zellfraktionen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen

Um einen Anhaltspunkt für die Entalkylierungs-Geschwindigkeiten durch die Zellfraktionen zu gewinnen, wurde die Entalkylierung von N-Methylanilin zu Anilin durch die bei der Messung des Leucineinbaues verwandten Zellfraktionen bestimmt. Dazu wurde die jeweilige Zellfraktion mit N-Methylanilin und einem $NAPDH_2$-regenerierenden System inkubiert und entstandenes Anilin nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt. Wie daraus hervorgeht, entalkyliert Homogenat schneller und stärker als 9000 x g Überstand, weitaus am wenigsten aktiv sind isolierte Mikrosomen.

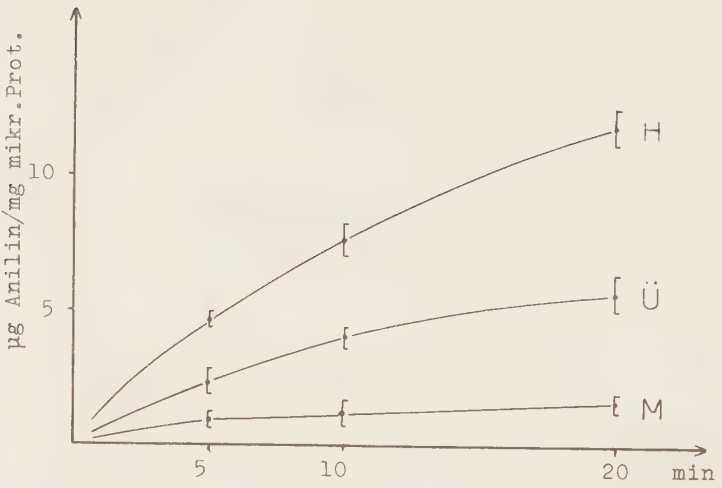

Abb. 3:
Entalkylierung von N-Methylanilin zu Anilin durch Mikrosomen (M), 9000 x g Überstand (Ü) und Homogenat (H). Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchen, wobei in jedem Versuch alle 3 Zellfraktionen aus den gleichen Tieren gewonnen wurden. Die Konzentrationen betrugen pro ml Ansatz: 5 µMol G-6-P, 0,32 µMol NADP, 0,15 Kornberg-Einheiten G-6-P-Dehydrogenase, 2 mg mikrosomales Protein, 1 uMol N-Methylanilin. Inkubation bei 37°C.

In einigen Versuchen wurde die Entalkylierung von N-Methylanilin in Ansätzen gemessen, die außer Mikrosomen und $NADPH_2$-regenerierendem System noch pH 5-Fraktion und ATP-regenerierendes System wie in leucineinbauenden Ansätzen enthielten (Abb. 4). Es zeigte sich, daß die $NADPH_2$-haltigen leucineinbauenden Ansätze wesentlich schneller Anilin aus N-Methylanilin bildeten als Ansätze, die nur Mikrosomen und $NADPH_2$-regenerierendes System enthielten.

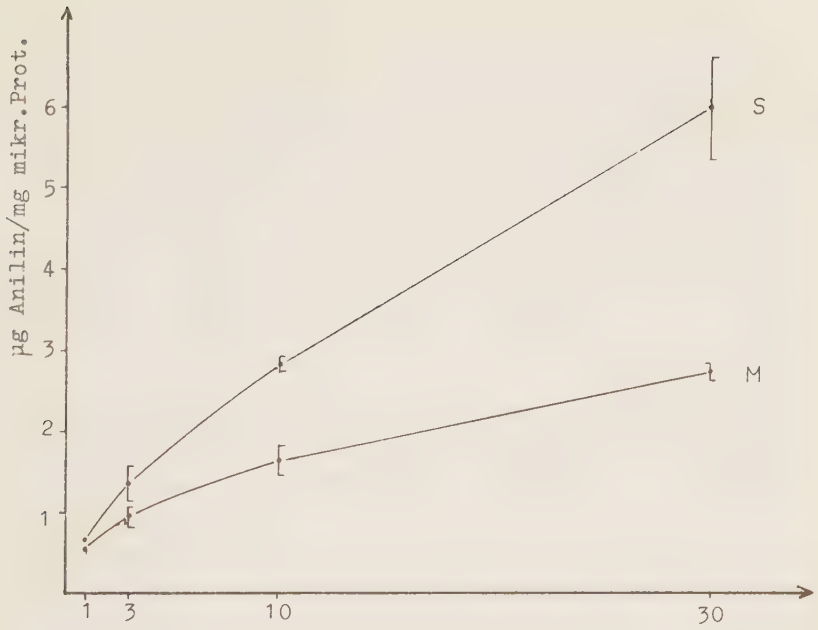

Abb. 4:
Entalkylierung von N-Methylanilin zu Anilin in $NADPH_2$-haltigen leucineinbauenden Ansätzen (S) und in Ansätzen, die nur Mikrosomen und $NADPH_2$-regenerierendes System enthielten (M). Mittelwerte aus 2 Versuchen. Mikrosomen und $NADPH_2$-regenerierendes System entstammten in beiden Ansatzarten den gleichen Zubereitungen und hatten die gleichen Endkonzentrationen. Konzentrationen pro ml Ansatz wie bei Abb. 3. Konzentration von pH-5-Fraktion und ATP-regenerierendem System im leucineinbauenden Ansatz wie bei Abb. 1. Inkubation bei 37°C.

2.2 Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff auf den Leucineinbau

In Standardansätzen aus Mikrosomen, aus 9000 x g Überstand und aus Homogenat verursachte CCl_4 keine deutliche Abweichung des Leucineinbaues gegenüber den Kontrollansätzen (Tab. 1).

Zugabe eines $NADPH_2$-regenerierenden Systems zum einbauenden Ansatz und dadurch erfolgte Metabolisierung von CCl_4 bewirkte ebenfalls keine Änderung des Leucineinbaues (Tab.2).

Auch bei Vorinkubation von CCl_4 mit Mikrosomen und einem $NADPH_2$-regenerierenden System zeigte sich keine Beeinflussung des Leucineinbaues (Tab. 3).

2.3 Einfluß von Buttergelb auf den Leucineinbau

Buttergelb reagiert in vitro normalerweise nicht mit Proteinen (65). In vivo, sowie in vitro in Zellfraktionen der Leber, wird DAB zu vielen Metaboliten umgesetzt und in bisher erst zum Teil bekannter Form an Proteine gebunden (41,66). Ein reaktionsfähiges Stoffwechselprodukt ist dabei DAB-N-Oxyd (41,66). Deshalb wurde auch das N-Oxyd auf seine Wirkung in den verschiedenen einbauenden Systemen untersucht.

In Standardansätzen aus Mikrosomen, aus 9000 x g Überstand oder aus Homogenat konnte keine deutliche Beeinflussung des Leucineinbaues durch DAB oder DAB-N-Oxyd beobachtet werden (Tab. 1).

In Anwesenheit eines $NADPH_2$-regenerierenden Systems im einbauenden Ansatz zeigten DAB und DAB-N-Oxyd ebenso wie nach Vorinkubation mit Mikrosomen und $NADPH_2$ keine Wirkung auf die Proteinsynthese (Tab. 2 u. 3).

2.4 Einfluß von Dimethylnitrosamin auf den Leucineinbau

Die Wirkung von Dimethylnitrosamin auf die Proteinsynthese wurde in vitro in verschiedenen Versuchsanordnungen untersucht. Dabei zeigte DMN weder in normalen einbauenden Systemen aus verschiedenen Leberzellpräparationen noch bei $NADPH_2$-Zugabe oder nach Vorinkubation mit $NADPH_2$ und Mikrosomen eine Änderung des Einbaues von ^{14}C-Leucin (Tab. 1, 2 u. 3).

2.5 Einfluß von Cyclophosphamid auf den Leucineinbau

Cyclophosphamid wurde einmal zu verschiedenen Eiweiß synthetisierenden Systemen aus Rattenlebern gegeben und der Leucineinbau gemessen. In solchen Ansätzen werden Fremdstoffe nicht metabolisiert. Die Ansätze mit Cyclophosphamid bauten Leucin nicht mit anderer Geschwindigkeit ein als die Kontrollansätze (Tab. 1).

Zum anderen wurde die Wirkung von Cyclophosphamid in Ansätzen gemessen, in denen Metabolisierung erfolgt. Entweder wurde $NADPH_2$ zu den Ansätzen hinzugefügt, so daß Cyclophosphamid während des Einbaues von Leucin metabolisiert wurde; oder Cyclophosphamid wurde mit Mikrosomen und $NADPH_2$ vorinkubiert, und der Aminosäureeinbau wurde danach durch Zugabe von ATP, pH 5-Fraktion und ^{14}C-Leucin gestartet. Der Leucineinbau war in diesen Ansätzen ebenfalls nicht gegenüber den Kontrollen verändert (Tab. 2 u. 3).

Tabellen

Zugabe +)	Leucineinbau in % der Kontrolle					
	Homogenat		Überstand		Mikrosomen	
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
CCl_4	103	92	84	103	81	108
DAB	111	98	109	101	103	102
DAB-N-Oxyd	98	93	92	101	92	89
DMN	95	110	108	95	93	91
Cyclophosphamid	99	95	92		95	92

Tab. 1:
Einfluß von CCl_4, DAB, DAB-N-Oxyd, DMN und Cyclophosphamid auf den ^{14}C-Leucineinbau in Homogenat, in 9000 x g Überstand und in Mikrosomen. Jeder Einzelwert ist der Mittelwert zweier Bestimmungen. Der Einbau ist in Prozent der zugehörigen Kontrolle (= 100 %) angegeben. Der einfache mittlere Fehler der Kontrollen betrug ± 7 % (N = 10).
Ansätze aus Mikrosomen enthielten je ml:
12 µMol Tris-HCl-Puffer, 30 µMol Sacharose, 17,5 µMol KCl, 20 µMol $MgCl_2$, 4,5 µMol Thioäthanol, 0,5 µMol GTP, 2 µMol ATP, 15 µMol PEP, 50 µg Pyruvatkinase, 2 mg mikrosomales Protein, 2 mg Protein der pH 5-Fraktion, 0,45 µCi 1-^{14}C Leucin.
Ansätze aus Überstand und aus Homogenat enthielten pro ml:
18 µMol Tris-HCl-Puffer, 10 µMol $MgCl_2$, 2,25 µMol Thioäthanol, 1 µMol ATP, 0,25 µMol GTP, 7,5 µMol PEP, 25 µg Pyruvatkinase, 0,45 µCi 1-^{14}C Leucin sowie die Menge Überstand bzw. Homogenat, die 2 mg mikrosomales Protein enthielt.
Inkubationsdauer 30 min bei 37°C. Ansatzvolumen 0,5 ml.

+) 2 µMol/ml Ansatz

Zugabe	Leucineinbau in % der Kontrolle					
	Homogenat		Überstand		Mikrosomen	
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
CCl_4	102	97	107	111	87	96
DAB	98	102	111	85	100	95
DAB-N-Oxyd	89	94	97	88	106	98
DMN	104	110	100	115	100	93
Cyclophosphamid	106	95	107		96	96

Tab. 2:
Einfluß von jeweils 2 µMol/ml CCl_4, DAB, DAB-N-Oxyd, DMN und Cyclophosphamid auf den Leucineinbau im Homogenat, im 9000 x g Überstand und in Mikrosomen bei Anwesenheit eines $NADPH_2$-regenerierenden Systems. Die Konzentrationen des NADPH-regenerierenden Systems betrugen pro ml Ansatz: 5 µMol G-6-P, 0,32 µMol NADP, 0,15 Kornberg-Einheiten G-6-P-Dehydrogenase.
Alle übrigen Bedingungen sind in Tabelle 1 angegeben.

Zugabe	Leucineinbau in % der Kontrolle	
	Exp. 1	Exp. 2
CCl_4	85	110
DAB	92	91
DAB-N-Oxyd	87	91
DMN	110	100
Cyclophosphamid	36	100

Tab. 3:
Einfluß von jeweils 2 µMol/ml CCl_4, DAB, DAB-N-Oxyd, DMN und Cyclophosphamid auf den Leucineinbau in Rattenlebermikrosomen nach 10 min Vorinkubation mit Mikrosomen und einem $NADPH_2$-regenerierenden System. Die Konzentrationen pro ml Vorinkubationsansatz betrugen: 10 µMol G-6-P, 0,64 µMol NADP, 0,3 Kornberg-Einheiten G-6-P-Dehydrogenase, 10 mg mikrosomales Protein, 10 µMol Zugabe. Nach 10 min Inkubation (= Vorinkubation) wurden diesem Ansatz 0,1 ml entnommen und zu 0,4 ml eines einbauenden Ansatzes mit der bei Tab. 1 angeführten Zusammensetzung gegeben. Nach 30 min bei 37°C wurde dann der Leucineinbau bestimmt.

3. DISKUSSION

D i m e t h y l n i t r o s a m i n greift in Zellfunktionen wahrscheinlich durch Alkylierung von Nucleinsäuren und Proteinen ein, die in zahlreichen Versuchen beobachtet wurde (10,36,37). Die Alkylierung erfolgt nicht direkt durch Dimethylnitrosamin, sondern durch Metaboliten, die von mikrosomalen Enzymen gebildet werden (32,41). Die Metabolisierung verläuft auch in vitro bei Anwesenheit von $NADPH_2$ sehr schnell (32). Entsprechend zeigte sich in unseren Versuchen bei Zugabe von Dimethylnitrosamin zu leucineinbauenden Systemen aus Homogenat, aus 9000 x g Überstand und aus Mikrosomen keine Veränderung der Proteinsynthese. Jedoch verlief der Aminosäureeinbau auch dann unverändert, wenn Dimethylnitrosamin in Lebermikrosomen von stimulierten Ratten durch Vorinkubation oder durch $NADPH_2$-Zugabe metabolisiert wurde. Diese Ergebnisse sind schwer mit den bisherigen Vorstellungen über den Angriffspunkt von Dimethylnitrosamin in Übereinstimmung zu bringen. MIZRAHI (43) postulierte eine Alkylierung der messenger Ribonucleinsäure, wodurch diese nicht mehr mit Ribosomen zu Polysomen reagieren kann. SMUCKLER (58) dagegen vermutet einen primären Angriff am Ribosom, wogegen aber die gute Poly-(U)-Stimulierbarkeit des Phenylalaninein baues in Dimethylnitrosamin vorbehandelten Zellfraktionen spricht. Aus unseren Versuchen geht hervor, daß bei der vorliegenden Versuchsanordnung keine der für die Proteinsynthese im Cytoplasma erforderlichen Faktoren beeinflußt werden, obwohl die vermutlich wirkenden Metaboliten mit großer Geschwindigkeit entstehen. Da als wesentlicher Faktor auch eine Störung der Synthese der messenger Ribonucleinsäure im Kern wegen der schnell nach Dimethylnitrosamingabe beobachteten Hemmung der Proteinsynthese unwahrscheinlich ist (64), müssen zur Erklärung des verminderten

Aminosäureeinbaues in Mikrosomen von Tieren, denen Dimethylnitrosamin verabreicht wurde, andere Faktoren eine Rolle spielen.

B u t t e r g e l b wird in der Leber zum Teil fest an cytoplasmatische Fraktionen gebunden (51), wobei reaktionsfähige Metaboliten eine wesentliche Rolle spielen (41). Auf diesem, in den einzelnen Schritten noch unbekannten Weg greift Buttergelb wahrscheinlich in das Zellgeschehen ein und bewirkt schließlich malignes Wachstum (41). Bindung reaktionsfähiger Metaboliten könnte auch die nach Gaben von Buttergelb (27) und 3-Methyl-buttergelb (11,18,19) an Ratten beobachtete Verminderung der Proteinsynthese in den aus den Lebern gewonnenen Zellfraktionen verursachen. Buttergelb wird in isolierten Lebermikrosomen bei Gegenwart von $NADPH_2$ metabolisiert und an Mikrosomenproteine gebunden (23,41,65). Unsere Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Proteinsynthese unter diesen Bedingungen weder im Homogenat, noch im 9000 x g Überstand oder in Suspensionen isolierter Mikrosomen von stimulierten Ratten verändert ist. Allerdings können Stoffwechsel und Bindung in vitro mit den Bedingungen in vivo aus den bisher vorliegenden Untersuchungen kaum verglichen werden. Immerhin ist aber bekannt, daß Buttergelb und besonders Buttergelb-N-Oxyd in vitro sehr schnell metabolisiert und an Zellproteine gebunden werden (23,65). Die vorhandenen Reaktionen beeinflussen nach unseren Ergebnissen für sich aber noch nicht die Proteinsynthese. Es ist möglich, daß Buttergelb nicht über cytoplasmatische Faktoren wirkt, sondern über den Zellkern, insbesondere über eine Beeinflussung der Synthese der messenger Ribonucleinsäure. Dafür spricht auch die gesteigerte Poly-(U)-Stimulierbarkeit und vor allem der relativ spät beginnende Hemmeffekt auf die Proteinsynthese nach Verabfolgung von Buttergelb in vivo (27). Die Bindung von Buttergelb an DNA und Proteine des Kernes

ist bereits nachgewiesen worden (51). Über einen solchen Wirkungsmechanismus könnten dann auch die von KETTERER et al. (27) parallel zur Aminosäureeinbauverminderung nach Buttergelb beobachteten Veränderungen am endoplasmatischen Retikulum gut erklärt und als Zwischenglied aufgefaßt werden.

T e t r a c h l o r k o h l e n s t o f f verändert nach Gabe in vivo die Proteinsynthese in zellfreien Aminosäuren einbauenden Leberpräparationen (56-63). In den Leberfraktionen wirkt CCl_4 jedoch nicht, wenn es erst in vitro zugesetzt wird. So sah SMUCKLER (57,58) keinen Einfluß auf isolierte Polysomen und wir haben das jetzt auch im Homogenat, im 9000 x g Überstand und in Mikrosomen bestätigt. Offenbar wirkt CCl_4 erst nach metabolischer Aktivierung. Metabolisierung wird nach bisherigen Befunden durch das Fremdstoff-oxydierende System der Lebermikrosomen ausgeführt. CCl_4 wird durch isolierte Mikrosomen bei Anwesenheit von $NADPH_2$ zu CO_2 abgebaut (55). DDT- und Phenobarbital-Vorbehandlung steigerte die Geschwindigkeit des Umsatzes (40). Nach den Untersuchungen von SEAWRIGHT et al. (55) wird dabei in vitro durch Lebermikrosomen in 10 min prozentual mehr CO_2 aus CCl_4 gebildet, als Ratten nach oralen Gaben in 2 Stunden mit der Atemluft ausatmen. Unsere Versuche zeigen jedoch, daß auch bei Metabolisierung des CCl_4 durch Mikrosomen von stimulierten Ratten die Proteinsynthese weder im Homogenat noch im 9000 x g Überstand oder in Mikrosomen beeinflußt wird. Nach den Untersuchungen SMUCKLERS (57,58) ist jedoch ein Angriff von CCl_4 außerhalb cytoplasmatischer Strukturen unwahrscheinlich. Für den Unterschied der Wirkungen von CCl_4 in vivo und in vitro kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht. Einmal kann die Wirkung der mikrosomalen Metaboliten in vivo anders als in vitro sein. Es ist jedoch auch möglich, daß in vivo andere Metaboliten als

in den von uns verwandten Versuchsanordnungen entstehen, d.h., daß die auf die Proteinsynthese wirkenden Metaboliten nicht von dem Fremdstoff-oxydierenden mikrosomalen Enzymsystem gebildet werden. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von SASAME et al. (52) interessant, die zur Erklärung der nach CCl_4-Gabe beobachteten Beeinträchtigung mikrosomaler Enzyme ebenfalls Metaboliten in Erwägung ziehen, die nicht durch Einwirkung der mischfunktionellen Oxydasen der Lebermikrosomen entstehen.

C y c l o p h o s p h a m i d wirkt erst nach metabolischer Aktivierung (6). RAUEN et al. (47) fanden im Blut von Ratten nach Cyclophosphamid-Gabe alkylierende Substanzen. Perfundierte isolierte Lebern sowie Leberscheiben vermögen aus Cyclophosphamid Derivate mit hoher cytostatischer Aktivität zu bilden (6). In zellfreien Systemen konnten aktive Metaboliten nur in Ansätzen aus Lebermikrosomen in Gegenwart von $NADPH_2$ nachgewiesen werden (6). Demnach sind die mikrosomalen mischfunktionellen Oxydasen das aktivierende System. Dafür spricht auch der Befund, daß Phenobarbitalgaben die alkylierende Aktivität im Blut nach Endoxan-Gabe stark erhöhen (48). Die bisherigen Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des "aktivierten" Endoxan^R richteten sich auf eine Hemmung des Nucleinsäurestoffwechsels in Zellkern und Mitochondrien (21,73). Denkbar ist jedoch auch ein direkter Angriff der aktiven Metaboliten auf cytoplasmatische Faktoren der Proteinsynthese. Deshalb verfolgten wir den Leucineinbau in Homogenat, 9000 x g Überstand und Mikrosomen unter Bedingungen, bei denen Cyclophosphamid metabolisiert wird. Der in allen Versuchsanordnungen fehlende Einfluß von Cyclophosphamid auf die Proteinsynthese läßt vermuten, daß Cyclophosphamid nicht einfach durch Bildung mikrosomaler Metaboliten in das cytoplasmatische System der Proteinsynthese eingreift.

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1 Abkürzungen

ATP = Adenosintriphosphat
CCl_4 = Tetrachlorkohlenstoff
DAB = N,N-4-Dimethylaminoazobenzol
DAB-N-Oxyd = N,N-4-Dimethylaminoazobenzol-N_4-Oxyd
DMN = N,N-Dimethylnitrosamin
DMSO = Dimethylsulfoxyd
G-6-P = Glucose-6-phosphat
GTP = Guanosintriphosphat
KRP = Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung
NADP = Nicotin-adenin-dinucleotidphosphat
PEP = Phosphoenol-pyruvat
Poly-(U) = Polyuridylsäure
TCE = Trichloressigsäure
Tris-HCl = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, mit HCl auf pH 7,6 eingestellt.

4.2 Chemikalien

ATP, GTP, PEP, Pyruvatkinase, NADP, G-6-P stammten von der Fa. Böhringer Mannheim GmbH, Mannheim; DMSO, DAB, CCl_4 von der Fa. E. Merck AG, Darmstadt; 1-^{14}C -Leucin von der Fa. NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain.
DAB-N-Oxyd wurde von STAHN nach der Methode von COSTA und PUXEDDU (9,68) erhalten.
DMN wurde nach HATT (17) synthetisiert.
Cyclophosphamid stellte dankenswerterweise die Fa. Asta, Brackwede zur Verfügung.

4.3 Tiere

Zu sämtlichen Versuchen wurden männliche Albinoratten vom Stamm Wistar benutzt, Gewicht: 100 - 150 g, Futter: Altromin^{R} Standard. Die Tiere erhielten zur Stimulierung an 5 Tagen hintereinander je 80 mg Phenobarbital/kg i.p.. Die letzte Injektion erfolgte 24 Std. vor der Tötung, das Futter wurde 48 Stunden vorher entzogen, wobei Trinkwasser frei zur Verfügung stand.

4.4 Lösungen

4.41 Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung (KRP)

Krebs-Ringer:	NaCl	9,0 g
	KCl	0,46 g
	KH_2PO_4	0,210 g
	$MgSO_4.7H_2O$	0,382 g
	in 1000 ml aqua dest.	

Krebs-Ringer-phosphatlösung: 3 Teile Krebs-Ringer + 1 Teil 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4

4.42 Krebs-Ringer-Phosphat-Thioäthanol-Lösung

Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung mit Thioäthanol 4,5 mM

4.5 Präparation der Zellfraktionen

4.51 Homogenat, 9000 x g Überstand, Mikrosomen

Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet, entblutet,

die Lebern so schnell wie möglich entnommen und in eiskalte KRP gelegt. Die Lebern wurden dann mit KRP gewaschen, anschließend mit Filterpapier getrocknet, gewogen und mit einer Schere zerkleinert. Der Leberbrei wurde entweder im Verhältnis 1 + 1,5 (bei Versuchen mit Homogenat und mit 9000 x g Überstand) oder 1 + 3 (bei Versuchen mit gewaschenen Mikrosomen) mit KRP-Thioäthanol-Lösung homogenisiert (=Homogenat), wobei zuerst ein handbewegter Glashomogenisator und dann ein motorgetriebener Kunststoffhomogenisator benutzt wurden. Das Homogenat wurde 20 min bei 9000 x g in einer Sorwall SS3 Automatic Superspeed Zentrifuge zentrifugiert, um Zellreste, Kerne und Mitochondrien zu entfernen. Der Überstand (= 9000 x g Überstand) wurde 60 min mit einer Spinco L Zentrifuge, Rotor 30, bei 78000 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Fettes wurde der 78000 x g Überstand für die pH 5-Fraktion benutzt. Der Niederschlag (= ungewaschene Mikrosomenfraktion) wurde mit 35 ml KRP-Thioäthanol-Lösung aufgenommen und erneut bei 78000 x g zentrifugiert (= Waschen der Mikrosomen). Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag (= gewaschene Mikrosomenfraktion) mit 4 ml KRP-Thioäthanol-Lösung pro Ultrazentrifugenröhrchen aufgenommen. In allen Versuchen mit Mikrosomen wurde diese gewaschene Mikrosomenfraktion verwandt. Der Proteingehalt der Mikrosomen wurde nach der von LOWRY et al. angegebenen Methode bestimmt (31) und zur Standardisierung der Mikrosomen-Konzentration benutzt. Der Gehalt an mikrosomalen Proteinen in Homogenat und 9000 x g Überstand wurde errechnet. Durch Verdünnung mit KRP-Thioäthanol-Lösung wurde der Gehalt an mikrosomalem Protein auf 20 mg/ml eingestellt.

4.52 Herstellung der pH 5-Fraktion

Die zur Aminosäureinkorporation notwendigen Enzyme und

transfer-Ribonucleinsäuren werden in der pH 5-Fraktion angereichert. Diese wird gewonnen, indem man den 78000 x g Überstand unter magnetischer Rührung mit 1 N Essigsäure bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 5 versetzt. Nach 10-minütigem Rühren wird das Präzipitat durch Zentrifugation bei 3000 x g abgetrennt und in 1 ml Lösung A pro 10 ml 78000 x g Überstand gelöst. Der pH wird dann mit 0,2 N KOH auf 7,6 eingestellt. Der Proteingehalt wurde wieder nach LOWRY (31) bestimmt und auf 20 mg/ml durch Verdünnen mit Lösung A eingestellt.

Lösung A: 0,02 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,4
0,01 M $MgCl_2$
0,04 M KCl
0,0056 M Thioäthanol

(nach MUNROE, JACKSON, CORNER (45))

Sämtliche Arbeitsgänge, sowohl die Herstellung der mikrosomalen Fraktionen als auch der pH 5-Fraktion, wurden im Kühllabor bei + 2° C durchgeführt. Die Präparationen wurden immer frisch benutzt.

4.6 Ansätze zur Messung des Leucineinbaues

Sämtliche Ansätze wurden bei + 2° C hergestellt. Zuletzt wurde immer ^{14}C-Leucin zugegeben (= Start). Unmittelbar nach Leucinzugabe wurde noch in der Kälte jeweils ein Wert abgenommen, der als 0-Wert diente. Die kompletten Ansätze wurden sodann im Wasserbad bei 37° C 30 min lang inkubiert. Bei kinetischen Studien wurden zusätzlich Werte nach 1, 3 und 10 min abgenommen. Bei sämtlichen Abnahmezeiten wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. DAB, DAB-N-Oxyd und CCl_4 wurden als Lösung in 0,01 ml oder 0,02 ml DMSO (42) zugegeben. Als Kontrollen dienten bei diesen Versuchen Ansätze,

die DMSO in der gleichen Konzentration wie im DAB-, DAB-N-Oxyd- und CCl_4-haltigen Ansatz enthielten. In Vorversuchen war gefunden worden, daß DMSO in den verwandten Konzentrationen den Leucineinbau nicht wesentlich beeinflußt. DMN wurde, jeweils frisch gelöst, als wässrige Lösung zugegeben.
Die Konzentrationen von DAB, DAB-N-Oxyd, CCl_4, DMN und Cyclophosphamid betrugen, wenn nicht anders angegeben, 2 µMol/ml Ansatz.
Das Ansatzvolumen betrug 0,4 - 0,5 ml.

4.61 Standardansatz bei Verwendung von Mikrosomen

Konzentrationen pro ml Ansatz:

12,00 µMol	Tris•HCl-Puffer pH 7,6
30,00 µMol	Saccharose
17,50 µMol	KCl
20,00 µMol	$MgCl_2.7\ H_2O$
4,50 µMol	Thioäthanol
0,50 µMol	GTP
2,00 µMol	ATP
15,00 µMol	Phosphoenolpyruvat
50,00 µg	Pyruvatkinase
2,00 mg	Protein pH 5-Fraktion
2,00 mg	mikrosomales Protein
0,45 µCi	1-^{14}C -Leucin, spez. Akt. 31 - 32 mCi/mMol

4.62 Standardansatz bei Verwendung von Homogenat und 9000 x g Überstand

Konzentrationen pro ml Ansatz:

18,00 µMol Tris-HCl-Puffer pH 7,6
10,00 µMol $MgCl_2.7\ H_2O$
2,25 µMol Thioäthanol
1,00 µMol ATP
7,50 µMol Phosphoenolpyruvat
25,00 µg Pyruvatkinase
0,25 µMol GTP
0,40 ml 9000 x g Überstand oder Homogenat = 2 mg mikrosomales Protein
0,45 µCi 1-^{14}C -Leucin, spez. Akt. 31 - 32 mCi/mMol

4.63 $NADPH_2$-regenerierendes System in leucineinbauenden Ansätzen

Wenn einem leucineinbauenden Ansatz $NADPH_2$-regenerierendes System zugesetzt wurde, lagen folgende Endkonzentrationen pro ml Ansatz vor:

5,00 µMol G-6-P
0,32 µMol NADP
0,15 Kornberg-Einheiten G-6-P-Dehydrogenase

Dabei wurde jeweils zunächst das komplette System in konzentrierter Form in KRP gelöst hergestellt und die tatsächliche Hydrierung von NADP anhand der Absorptionsänderung bei 360 mu im Photometer kontrolliert (25).

4.64 Vorinkubation mit $NADPH_2$-regenerierendem System

In einigen Versuchen wurden die zu untersuchenden Substanzen mit Mikrosomen und einem $NADPH_2$-regenerierenden System 10 min bei 37° C inkubiert (= Vorinkubation) und erst danach dem leucineinbauenden Ansatz zugegeben.
Die Konzentrationen im Vorinkubationsansatz betrugen pro ml Ansatz:

10,00 µMol G-6-P
0,64 µMol NADP
0,30 Kornberg-Einheiten G-6-P-Dehydrogenase
10,00 mg mikrosomales Protein
10,00 µMol der zu untersuchenden Substanz.

Nach der Vorinkubation wurde dem Vorinkubationsansatz 0,1 ml entnommen und zu 0,4 ml eines leucineinbauenden Standard-Ansatzes gegeben, der nicht-vorinkubierte Mikrosomen enthielt. Nach 30 min Inkubation bei 37° C wurde dann der Leucineinbau gemessen.

4.7 Quantitative Bestimmung des Aminosäureeinbaues in Protein

Nach der Methode von MANS und NOVELLI (39) wurden nach den Inkubationszeiten jeweils 0,05 ml jedes Ansatzes auf Filterpapierscheiben, Durchmesser 25 mm (von Fa. Schleicher & Schüll, Marke Selekta), mit einer Pipette aufgetragen; pro Ansatz immer zwei Werte. Die Plättchen wurden dann 15 sec durch Warmluft etwas angetrocknet und danach in eiskalte Lösung aus 10 %iger TCE mit 0,1 % nicht markiertem Leucin gegeben, mindestens 3 ml pro Plättchen. Darin wurden sie für mindestens 3 Stunden, im allgemeinen jedoch über Nacht, belassen. Dann wurden die Plättchen der Reihe nach

in folgenden Flüssigkeiten jeweils 20 min lang gewaschen:

1. 5 %ige TCE
2. 5 %ige TCE
3. 5 %ige leicht siedende TCE (80°C)
4. 5 %ige TCE
5. absoluter Alkohol
6. absoluter Alkohol
7. über KOH getrockneter Äther
8. wie 7.

Nach dem Waschen wurden die Plättchen mit einem Föhn getrocknet, in Zählgläschen gelegt und 7 ml eines Scintillators aus 5 g PPO + 0,1 g Dimethyl-POPOP pro 1 Toluol zugegeben. Es wurde in einem Packard Scintillation-counter ausgezählt. Die gemessene Radioaktivität wurde auf Impulse pro Minute pro mg mikrosomalen Proteins berechnet (= Ipm/mg mikr. Prot.).

4.8 Entalkylierungsansätze

Zur Beurteilung der Stoffwechselaktivität der Zellfraktionen wurde jeweils die Entalkylierung von N-Methylanilin gemessen (68). Diese Ansätze enthielten $NADPH_2$-regenerierendes System und Mikrosomen in denselben Konzentrationen wie die Aminosäuren einbauenden Ansätze, sowie N-Methylanilin in einer Konzentration von 1 µMol/ml Ansatz. Das Volumen betrug 5 ml, aufgefüllt wurde mit KRP. Die Ansätze wurden bei 37° C im Wasserbad unter Luft geschaukelt. Durch Zugabe von N-Methylanilin wurde die Reaktion gestartet. Sofort nach Inkubationsbeginn wurde 1 ml Ansatz entnommen, der als 0-Wert diente. Als weitere Werte wurden je 1 ml Ansatz nach 5, 10 und 20 min abgenommen. Die Abnahmen von jeweils 1 ml wurden zu jeweils 2 ml 10 %iger TCE gegeben, das ausfallende Eiweiß wurde abzentrifugiert, und in 2 ml Überstand wurde das gebildete Anilin bestimmt. Die gebildeten Mengen Anilin

wurden auf mg mikrosomales Protein im Ansatz bezogen und als µg Anilin/mg Mikrosomen angegeben.

4.9 Bestimmungsmethoden

4.91 Anilinbestimmung (68)

1 ml Ansatz wurde immer zu 2 ml 10 %iger TCE gegeben. Danach ausfallendes Eiweiß wurde abzentrifugiert. Zu 2 ml des klaren Überstandes wurden 0,2 ml einer 0,5 %igen $NaNO_2$-Lösung gegeben und gut geschüttelt; nach 20 min wurden 0,2 ml einer 2 %igen Ammoniumsulfamat-Lösung zugegeben und 5 min kräftig geschüttelt. Dann wurden 0,5 ml einer 50 %igen Na-Acetat-Lösung und 0,2 ml einer 0,5 %igen NAD-Lösung (N-(Naphthyl-(1)-)äthylendiaminchlorid) hinzugefügt; nach 20 min Zugabe von 0,2 ml einer 25 %igen HCl. Die Messung erfolgte bei 555 mµ im Zeiss-Spektrophotometer. Die Anilinkonzentration wurde dann an der Eichkurve abgelesen.

4.92 Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (31)

Reagentien:

1. Lösung A: es wurden angesetzt
   a: 2,7 g Seignettesalz.4 H_2O in 100 ml H_2O
   b: 1,0 g $CuSO_4$.5 H_2O in 100 ml H_2O
   c: 26,5g Na_2CO_3.10 H_2O in 490 ml H_2O
   Frischer Ansatz: c + b + a = 98 + 1 + 1
2. Folinreagens "Merck" mit H_2O 1 : 1 verdünnt = 1 N sauer
3. 1 N NaOH

Eichlösung: Humanalbumin trocken, "reinst" (Behringwerke).

Durchführung:
0,5 ml Probe wurden mit 0,5 ml NaOH und 5 ml Lösung A versetzt. Nach 10 min wurden unter kräftigem Umschütteln 0,5 ml Folinreagens in kleinen Portionen zugegeben. Nach 30 min wurde die Extinktion gegen die Leerprobe bei 750 mμ gemessen und die Proteinkonzentration aus der Eichkurve abgelesen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Wir untersuchten den Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff, Buttergelb, Buttergelb-N-Oxyd, Dimethylnitrosamin und Cyclophosphamid auf den Einbau von Leucin in verschiedenen Leberfraktionen (Homogenat, 9000 x g Überstand, Mikrosomen) von Ratten, die mit Phenobarbital vorbehandelt waren.

1. Diese Substanzen führten in einer Konzentration von 2 µMol/ml Ansatz zu keiner Änderung des Leucineinbaues.
2. Zugabe von $NADPH_2$ zu den einbauenden Ansätzen und dadurch bewirkte Metabolisierung dieser Verbindungen veränderte die Geschwindigkeit des Einbaues von Leucin nicht.
3. Nach Vorinkubation mit $NADPH_2$ und Mikrosomen beeinflußten die genannten Verbindungen und ihre dabei entstandenen Stoffwechselprodukte den Leucineinbau ebenfalls nicht.
4. Die Aktivität der mikrosomalen Oxygenasen wurde anhand der Entalkylierung von N-Methylanilin (1 uMol/ml Ansatz) bestimmt. Die Entalkylierungsrate in den ersten 10 min der Inkubation betrug: in Homogenaten 16,4 %, in 9000 x g Überstand 8,8 %, in Ansätzen mit gewaschenen Mikrosomen 3,6 %.
5. Die nach Verabreichung von Buttergelb, Dimethylnitrosamin und Tetrachlorkohlenstoff an Tiere beobachtete Verminderung des Aminosäureeinbaues in Leberzellpräparationen, als deren Ursache in der Leber gebildete Metaboliten vermutet werden, ließ sich in vitro nicht nachweisen, obwohl Mikrosomen mit hoher Aktivität der mischfunktionellen Oxydasen benutzt wurden. Bei Applikation dieser Verbindungen an Ratten sind demnach andere Faktoren für die Änderung der Proteinsynthese in den später aus ihren Lebern gewonnenen Zellfraktionen verantwortlich als nur die mikrosomale Bildung von Metaboliten.

Für diese Diskrepanz zwischen der Wirkung der untersuchten Verbindungen in vivo und unseren Beobachtungen in vitro gibt es eine Reihe nur wenig befriedigender Erklärungsmöglichkeiten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALPERS, D.H. und K.J. ISSELBACHER: Carbon tetrachloride Toxicity: The independenca of effects on protein synthesis and lipid peroxidation.
Fed. Proc. 26, 2 (1967).

2. APPLEBAUM, S.W., R.P. EBSTEIN und G.R. WYATT: Dissotiation of ribonucleic acid from silkmoth pupae by heat and dimethylsulfoxid: evidence for specific cleavage points.
J. molec. Biol. 21, 29 (1966).

3. ARRHENIUS, E.: Effects on hepatic microsomal N- und C-Oxygenation of aromatic amines by in vivo corticosteroid or aminofluorene treatment or stress.
Cancer Research 28, 264 (1968).

4. BENNETT, J. und T. HALLINAN: The attachment of ribosomes to the endoplasmic reticulum of liver.
Life Sciences 7, 553 (1968).

5. BRETCHER, M.S.: Protein synthesis - hybrid structure model.
Nature, 218, 5142 (1968).

6. BROCK, N. und H.-J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro.
Arzneimittelforschung 13, 1021 (1963).

7. BULLOCK, G., A.M. WHITE und J. WORTHINGTON: The effects of catabolic and anabolic steroids on amino acid incorporation by sceletal - muscle ribosomes.
Biochem. J. 108, 417 (1968).

8. CAMPBELL, P.N. und J.R. SARGENT: Techniques in protein biosynthesis.
London, New York: Academic Press 1966.

9. COSTA, G. und A. PUXEDDU: p - dimethylaminoazobenzole - N - ossido.
Gazz. chim. ital. 69, 1050 (1959).

10. CRADDOCK, V.M. und P.N. MAGEE: Analysis of bases of rat liver nucleic acids after administration of the carcinogen dimethylnitrosamine.
Biochem. J. 100, 724 (1966).

11. DAUDEL, P., A. JAQUER und A. TOUPLAIN: Effect de quelques aziques sur l'incorporation de L-lencine par un système microsomal de foie.
C.R.Acad.Sci., Paris, 260, 4871 (1965).

12. EMMELOT, P., I.J. MIZRAHI und E. KRIECK: Prevention by cysteamine of the inhibitory effect of carcinogenic N - nitroso - dialkylamines on incorporation of amino acids in rat liver.
Nature 193, 1158 (1962).

13. FRESTON, J.W. und J.A.D. BOUCHIER: Potentiation of carbon tetrachloride toxicity dy dimethylsulfoxide.
Nature 214, 734 (1967).

14. GERHARDS, E. und H. GIBIAN: The metabolism of dimethyl-sulfoxide and its metabolic effects in man and animals.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 141, 65 (1967).

15. GOLDSTEIN, S. and W.J. REDDY: Insulin stimulation of ^{14}C-Leucin incorporation into protein.
Biochim. Biophys. Acta 150, 733 (1968).

16. HARDIN, B.L.: Carbon tetrachloride poisoning - a review.
Ind. Med. Surg. 23, 93 (1954).

17. HATT, H.H.: Dimethylhydrazine Hydrochloride
Org. Synth. 2, 211 (1948).

18. HAWTREY, A.O. und L.D. NOURSE: The effect of 4-dimethylamino-3-methylazobenzene on ^{14}C labelled amino acid incorporation by rat liver polysome preparations.
Biochem. J. 98, 682 (1966).

19. HAWTREY, A.O., V. SCHIRREN und J. DIGKSTRA: Studies on azo-dye carcinogenesis in rat liver: the effect of 4-dimethylamino-3-methylazobenzene on the incorporation of ^{14}C-leucine in rat liver microsomal protein.
Biochem. J. 88, 106 (1963).

20. HEATH, D.F. und A. DUTTON: The detection of metabolic products from dimethylnitrosamine in rats and mice.
Biochem. J. 70, 619 (1958).

21. HELGE, H., E. OBERDISSE und K. ENGELS: Hemmbarkeit der DNA-Polymerase in Zellkernen und Mitochondrien von Leber- und Tumorgewebe durch Cyclophosphamid.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exper. Path. 260, 139 (1968).

22. HRADEC, J.: Effect of some polycyclic aromatic hydrocarbons on protein synthesis in vitro.
Biochem. J. 105, 251 (1967).

23. HULTIN, T.: Reactions of ^{14}C labelled carcinogenic azo dyes with rat liver proteins.
Exp. Cell Res. 13, 47 (1957).

24. HULTIN, T., E. ARRHENIUS und P.N. MAGEE: Inhibition by dimethylnitrosamine of incorporation of labelled amino acids into proteins of rat liver preparations in vitro.
Biochem. J. 76, 109 (1960).

25. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1967).

26. KATO, R., W.R. JONDORF, L.A. LOEB, T. BEN und H.V. GELBOIN: Studies on the mechanism of drug - induced microsomal enzyme activities: V phenobarbital stimulation of endogeneous messenger ribonucleic acid and on polyuridylic acid - directed ^{14}C-phenylalanin incorporation.
Mol. Pharmacol. 2, 171 (1966).

27. KETTERER, B., S.J. HOLT und P. ROSS-MANSELL: The effect of a single dose of the hepatocarcinogen dimethylaminoazobenzene on the rough-surfaced endoplasmic reticulum of the liver of the rat.
Biochem. J. 104, 692

28. KIDSON, C. und K.S. KIRBY: Selective alterations of mammalian messenger-RNA synthesis: evidence for differential action of hormons on gene transcription.
Nature 203, 599 (1964).

29. KIESE, M. und H. UEHLEKE: Der Ort der N-Oxidation des Anilins im höheren Tier.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exper. Path. 242, 117 (1961).

30. KOCSIS, J.J.: Dimethylsulfoxide: Interactions with hydrocarbons.
Science 160, 427 (1968)

31. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193, 165 (1951).

32. MAGEE, P.N.: Cellular injury and alkylation of cell components.
Ciba Symposium cellar injury 1964, S. 1.

33. MAGEE, P.N.: Toxic liver injury: the metabolism of dimethylnitrosamine
Biochem. J. 64, 676 (1956).

34. MAGEE, P.N.: Toxic liver injury: inhibition of protein synthesis in rat liver by dimethylnitrosamine in vivo. Biochem. J. 70, 606 (1958).

35. MAGEE, P.N. und M. VANDEKAR: Toxic liver injury: the metabolism of dimethylnitrosamine in vitro. Biochem. J. 70, 600 (1958).

36. MAGEE, P.N. und E. FABER: Toxic liver injury and carcinogenesis: methylation of rat liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. Biochem. J. 83, 114 (1962).

37. MAGEE, P.N. und T. HULTIN: Toxic liver injury and carcinogenesis: methylation of proteins of rat liver slices by dimethylnitrosamine in vitro. Biochem. J. 83, 106 (1962).

38. MAINZER, K.: Die Wirkung von Pharmaka auf die Eiweiß-synthese in einem zellfreien System aus Kaninchen-reticulozyten. Zeitschr. für die gesamte exp. Medizin 147, 60 (1968).

39. MANS, R.J. und G.D. NOVELLI: Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-disk method. Arch. Biochem. Biophys. 94, 48 (1961).

40. McLEAN, A.E.M. und E.K. McLEAN: The effect of Diet and 1,1,1-Trichloro-2,2-bis-(p-Chlorophenyl)-ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. Biochem. J. 100, 564 (1966).

41. MILLER, J. und E. MILLER: Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interaction with macromolecules. Pharmacol. Rev. 18, 805 (1966).

42. MILLER, J., E. MILLER, D. McKECHNIE und M.M. POIRIER: Inhibition of amino acid incorporation in vitro by metabolites of 2-acetylaminofluorene and by certain nitroso compounds.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 120, 538 (1965).

43. MIZRAHI, I.J. und P. EMMELOT: On the mode of action by which the carcinogen dimethylnitrosamine inhibits protein synthesis in the liver.
Biochem. Biophys. Acta 91, 362 (1960).

44. MUKHERJEE, T., R.G. GUSTAVSSON, B.A. AFZELIUS und E. ARRHENIUS: Effects of carcinogenic amines on amino acid incorporation by liver systems: a morphological and biochemical study on the effect of dimethylnitrosamine.
Cancer Research 23, 944 (1963).

45. MUNROE, B.J., R. JACKSON und A. CORNER: Studies on the nature of polysomes.
Biochem. J. 92, 289 (1964).

46. PARTHIER, B., E.A. SMUCKLER und T. HULTIN: A comparison between preincubated and non-preincubated rat liver ribosomes in the poly-(u) directed phenylalanine incorporation and binding reactions.
Biochem. Biophys. Acta 145, 446 (1967).

47. RAUEN, H.M. und U. DIRSCHKA: Bis-(ß-chloräthyl)-amin und N-ß-chloräthyl-aziridin als Folgeprodukte der biologischen Aktivierung von Cyclophosphamid.
Arzneimittelforschung 14, 159 (1964).

48. RAUEN, H.M. und K.-P. KRAMER: Der Gesamtalkylantien-Blutspiegel von Ratten nach Verabreichung von Cyclophosphamid und Acyclophosphamid.
Arzneimittelforschung 14, 1066 (1964).

49. RECKNAGEL, R.A.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity.
Pharmacol. Rev. 19, 145 (1967).

50. REMMER, H: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exper. Path. 235, 279 (1959).

51. ROBERTS, J.J. and G.P. WARWICK: The covalent binding of metabolites of dimethylaminoazobenzene, ß-Naphthylamine and aniline to nucleic acids in vivo. Int. J. Cancer 1, 179 (1966).

52. SASAME, H.S., J.A. CASTRO und J.R. GILETTE: Studies on the destruction of liver microsomal cytochrom P 450 by carbon tetrachloride administration. Biochem. Pharmacol. 17, 1769 (1968).

53. SCHMIDT-Volkmar, W.: Der Einfluß von Hunger und Phenobarbitalbehandlung auf die Aktivität der hydroxylierenden mikrosomalen Enzyme der Ratte. Dissertation, Tübingen 1966.

54. SCHOELLER, K.H., E. MULLER und U.v. PLEHWE: Über den Einfluß von Halothan und Chloroform auf die Proteinsynthese der normalen und aktivierten Rattenleber. Anästhesist 17, 87 (1968).

55. SEAWRIGHT, A.A. und A.E.M. McLEAN: The effect of Diet on carbon tetrachloride metabolism. Biochem. J. 105, 1055 (1967).

56. SMUCKLER, E.A.: Polysome changes in acute toxic liver injury requires the intact cell. Fed. Proc. 24, 556 (1965).

57. SMUCKLER, E.A.: Structural and functional alteration of the endoplasmic reticulum in liver. In: Structure and function of the endoplasmic reticulum in animals cells. Universitätsforlaget Oslo, Academic Press London & New York 1968 S. 13 - 56.

66. UEHLEKE, H.: Biologische Oxidation und Reduktion am Stickstoff aromatischer Amino- und Nitroderivate und ihre Folgen für den Organismus. Arzneimittelforschung 8, 195 (1964).

67. UEHLEKE, H. und V. STAHN: Oxydative Entmethylierung von Buttergelb und ribosomale Proteinsynthese. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exper. Path. 257, 75 (1967).

68. UEHLEKE, H. und V. STAHN: Zur biologischen Bildung von N,N-dimethylanilin-N-oxid und N,N-dimethylaminoazobenzol-N_4-oxid aus den Aminen sowie ihre Reaktionen mit Methämoglobin und mit Lebermikrosomen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exper. Path. 255, 287 (1966).

69. v.d.DECKEN, A.: Evidence for regulation of protein synthesis at the translation level in response to dietary alterations. J. Cell Biol. 33, 657 (1967).

70. v.d.DECKEN, A.: Modification of the in vitro amino acid incorporation capacity of rat liver after in vivo and in vitro treatment. Europ. J. Biochem. 4, 87 (1968).

71. WACKER, A. und K.P. MOHRBUTTER: Einfluß von Dimethylsulfoxid auf die zellfreie Proteinsynthese. Naturwissenschaften 54, 90 (1967).

72. WEISBURGER, J.H. und E.K. WEISBURGER: Pharmacodynamics of carcinogenic azo dyes, aromatic amines and nitrosamides. Clin. Pharmacol. Therap. 4, 110 (1963).

73. WILMANNS, H.: Chemotherapie maligner Tumoren. 3. Bielefelder Symposium, 1962. F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart.

L e b e n s l a u f

Am 1. Oktober 1941 wurde ich, Fritz Schnitger, als Sohn von Musikdirektor Herbert Schnitger und seiner Ehefrau Elfriede, geborene Vogel, in Berlin geboren.

In Heuchlingen/Schwäb. Alb und Bargteheide/Holst. besuchte ich die Grundschule, in Darmstadt die Justus-Liebig-Schule Gymnasium für Jungen. Im Jahre 1960 schloß ich die Schulausbildung mit dem Abitur ab und immatrikulierte mich im Sommersemester 1960 an der medizinischen Fakultät der Universität Frankfurt. Dort bestand ich im Herbst 1961 die naturwissenschaftliche, im Sommer 1963 die ärztliche Vorprüfung. Nach klinischem Studium in Kiel, Düsseldorf und Frankfurt schrieb ich mich für das Wintersemester 1965/66 an der Universität Münster in die Medizinische Fakultät ein und bestand hier im Sommer 1967 das medizinische Staatsexamen.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 19 a
Telefon 29 10 63

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 19 a
Telefon 291063